

不同氮源对布朗葡萄藻生长、总脂和总烃含量的影响

胡章喜¹, 安 民², 段舜山^{1,*}, 徐 宁¹, 孙凯峰¹, 刘晓娟¹, 李爱芬¹, 张成武¹

(1. 暨南大学水生生物研究中心 广东广州 510632; 2. 查尔斯特大学 澳大利亚)

摘要:以能源微藻布朗葡萄藻 *Botryococcus braunii* 764 和 *Botryococcus braunii* 765 为实验材料, 采用实验室一次性培养的方法, 研究了不同氮源及浓度对其生长、总脂和总烃含量的影响。结果表明, *B. braunii* 764 和 *B. braunii* 765 的最适氮源均为硝态氮, 且均能够利用硝态氮、亚硝态氮、铵态氮和尿素进行生长, 但是不同氮源及其浓度对这两株藻的生长、总脂和总烃含量的影响不同。*B. braunii* 764 生长速度较 *B. braunii* 765 缓慢, 但是 *B. braunii* 764 的总脂和总烃含量均高于 *B. braunii* 765, 最高分别达 27.61% 和 34.21%。以硝态氮为氮源时, *B. braunii* 764 的细胞 OD 值、生物量、总脂和总烃含量分别为 1.38、1.81 g/L、27.61% 和 34.21%, 均显著高于其它试验组, 而以尿素为氮源时, *B. braunii* 765 的最大 OD 值为 1.87, 以硝态氮为氮源时, 其生物量 (2.15 g/L) 和总烃含量 (27.89%) 最高, 而铵态氮对二者生长的促进作用以及总脂和总烃含量的影响不明显。综合考虑, 硝态氮是两株葡萄藻较为理想的氮源, 而 *B. braunii* 764 可以作为一种较有潜力的能源微藻进行开发利用。

关键词: 布朗葡萄藻; 氮源; 生长; 总脂; 总烃; 能源微藻

文章编号: 1000-0933(2009)06-3288-07 中图分类号: Q142, Q145, Q178, Q949 文献标识码: A

Effects of nitrogen sources on the growth, contents of total lipids and total hydrocarbons of *Botryococcus braunii*

HU Zhang-Xi¹, AN Min², DUAN Shun-Shan^{1,*}, XU Ning¹, SUN Kai-Feng¹, LIU Xiao-Juan¹, LI Ai-Fen¹, ZHANG Cheng-Wu¹

¹ Research Center of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

² Environmental and Analytical Laboratories, Faculty of Science, Charles Sturt University, NSW, 2678, Australia

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(6): 3288 ~ 3294.

Abstract: Two microalgae strains, *Botryococcus braunii* 764 and *Botryococcus braunii* 765, were chosen for studying the effects of different nitrogen sources and concentrations on the growth, total lipids and total hydrocarbons of energy microalgae in laboratory. These culture were grown in Chu10 media at ca. 24 °C, light intensity of ca. 100 μmol photons · m⁻² · s⁻¹, and light-dark cycle of 12:12. Four nitrogen sources, ie. nitrate, nitrite, ammonium and urea, and six concentrations of 0.5, 1, 2, 4, 8 and 10 mmol N/L for each source were applied. The results showed that all four nitrogen sources could be utilized by both *B. braunii* 764 and *B. braunii* 765 for their growth, which, however, varied significantly with nitrogen sources, nitrogen concentrations and microalgae strains. Nitrate was the optimal nitrogen source for the growth of both microalgae strains. The optical density, biomass, total lipids and total hydrocarbons of *B. braunii* 764 with nitrate were 1.38, 1.81 g/L, 27.61% and 34.21% (of its cell dry weight), respectively, which were significantly higher than that of other three nitrogen sources, while for *B. braunii* 765 the biomass and total hydrocarbons with nitrate were also higher than that of other nitrogen treatments, being 2.15 g/L and 27.89%, respectively, with the exception of the optical density that was the highest with urea (1.87). In comparison with *B. braunii* 765, the growth rate of *B. braunii* 764 was

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40876074, 40776078); 珠海市科技计划重点资助项目 (PC20061045)

收稿日期: 2008-07-23; 修订日期: 2009-03-16

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tssduan@jnu.edu.cn

a little slow, but its total lipids and total hydrocarbon were higher than that of *B. braunii* 765, being 27.61% and 34.21%, respectively, compared with 15.75% and 27.89% for *B. braunii* 765. Significant hormesitic effects with nitrogen concentrations were also observed for both microalgae strains. At the concentration of 2.0 mmol N/L nitrate both the total lipids and total hydrocarbon of *B. braunii* 764 were the highest, 27.61% and 34.21%, respectively, while *B. braunii* 765 reached its highest total lipids of 15.75% at the concentration of 4.0 mmol N/L nitrite, and total hydrocarbons of 27.89% at the concentration of 8.0 mmol N/L nitrate. Our findings indicated that overall *B. braunii* 764 could be considered as an energy alga candidate for the further exploitation and utilization of its potential.

Key Words: *Botryococcus braunii*; nitrogen sources; total lipids; total hydrocarbons; energy algae

葡萄藻(*Botryococcus braunii*)隶属于黄藻门(Xanthophyta)、黄藻纲(Xanthophyceae)、柄球藻目(Mischococcales)、葡萄藻科(Botryococcaceae)、葡萄藻属(*Botryococcus*)^[1],是一种世界性分布的淡水单细胞微藻,含有较高的胞外多糖、脂肪酸,尤其是含烃量,最高可达细胞干重的85%^[2,3],远远高于其它微生物,燃烧后对大气CO₂含量无净增加,而且葡萄藻所产烃的组成和结构与石油极其相似^[4,5],因此,利用葡萄藻生产石油替代品具有潜在的应用价值。然而葡萄藻生长速度缓慢,倍增时间长,因此研究葡萄藻生长的环境条件对缩短葡萄藻代时、提高生长速率、实现高密度培养十分关键。

氮作为微藻生长必需的基本元素之一,能够合成藻体内蛋白质、核酸、叶绿素,同时也是形成嘌呤、嘧啶、朴琳、氨基糖和胺化合物的基本要素,因此氮对于藻类的生长、发育、繁殖等生理活动有着重要的作用。而微藻可以利用的氮源范围较宽,无机氮源如氨氮、硝态氮,以及有机氮源,如尿素、酵母膏、胰蛋白胍和氨基酸等,但是不同的藻种对氮源的适应性有差异。并且不同的氮源和浓度对微藻的生理生化特性影响较大,如微藻的生长状况^[6]、胡萝卜素^[7]、胞外多糖^[8]、脂肪酸的含量^[9],以及酶活性等^[10]。本文研究了不同氮源对葡萄藻764株和765株生长、总脂和总烃含量的影响,以期为优良葡萄藻株的筛选和高密度培养提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验藻种

葡萄藻764株和765株均由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。

1.2 培养条件

1.2.1 培养基

实验采用Chu10培养基,分别选取NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、NH₄⁺-N 3种无机氮和NH₂CONH₂1种有机氮作为*B. braunii* 764和*B. braunii* 765生长的N源,NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、NH₄⁺-N和NH₂CONH₂的浓度均分别设置N为0.5、1、2、4、8 mmol/L和10 mmol/L,培养液中除N以外的其它成分和用量同Chu10,分别进行单因子一次性实验。

1.2.2 培养方法

将培养至对数生长期的藻种转接到装有300 ml无菌培养基的三角瓶(500 ml)中,使其初始OD₆₈₀约为0.1,将三角瓶置于培养室中进行一次性培养(采用空气压缩泵通入湿空气培养,空气量约为3 L/min)。光照强度约100 μmol photons·m⁻²·s⁻¹,光暗周期12:12,温度为(24±1)℃,光源为日光灯,隔天取适量藻液进行生长参数的测定。实验设置3个平行。

1.3 测定指标和测试方法

(1) 细胞生长的测定

每隔48h取样,用UV-2450型紫外分光光度计测定藻液在680 nm波长处的吸光值,用OD₆₈₀变化表征细胞的生长情况。

(2) 生物量

在生长末期,取一定体积的藻液,离心(10000 r/min, 10 min)收集藻细胞,双蒸水洗涤两次后10000 r/min

离心 5 min, 经冷冻干燥机(德国, VirTis wizard 2.0)干燥, 称重, 以单位体积干重来表示其生物量。

(3) 总脂的测定

参照 Bligh 等^[11] 和 Chen 等^[12] 的干重法。称取一定量干藻粉用 1.6 ml 蒸馏水悬浮, 加入 6 ml 甲醇/氯仿混合液(2:1, 体积分数)振荡 2 h, 离心, 将氯仿层转移至预先称重的螺口试管中, 60 °C 下用氮气将氯仿吹干, 称重。螺口试管前后质量之差即为总脂质量, 用以下公式计算总脂百分含量:

$$\text{总脂百分含量} = (\text{总脂质量} / \text{藻粉质量}) \times 100\%$$

(4) 总烃的测定

参照 Sawayama 等^[13] 的方法。称取一定质量的藻粉, 加入 15 ml 正己烷在研钵中充分混匀, 然后离心, 收集正己烷提取液。将沉淀物重复上述过程 2 次以上, 收集所有的正己烷提取液, 转移至预先称重的螺口试管中, 然后在室温下用氮气将正己烷吹干, 称重。螺口试管前后质量之差即为总烃质量, 用以下公式计算总烃百分含量:

$$\text{总烃百分含量} = (\text{总烃质量} / \text{藻粉质量}) \times 100\%$$

1.4 数据分析

使用 Excel 和 SPSS11.5 软件对所有数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对两株葡萄藻生长的影响

不同浓度的硝态氮、亚硝态氮、氨氮和尿素对 *B. braunii* 764 和 *B. braunii* 765 的生长均表现出不同程度的促进作用(图 1A, B, C 和图 1D; 图 2A, B, C 和图 2D)。对于 *B. braunii* 764 而言, 以硝态氮为氮源时, 其 OD 值显著高于其他 3 种氮源试验组($p < 0.05$), 0.5 ~ 10 mmol N/L 的硝态氮均明显促进其生长, 中等浓度的亚硝态氮和尿素促进其生长, 而氨氮却表现出低浓度促进其生长, 生长速度较缓慢。对于 *B. braunii* 765 而言, 以尿素为氮源时, 其 OD 值均高于其他 3 种氮源试验组, 差异显著($p < 0.05$), 同样地, 中等浓度的硝态氮、亚

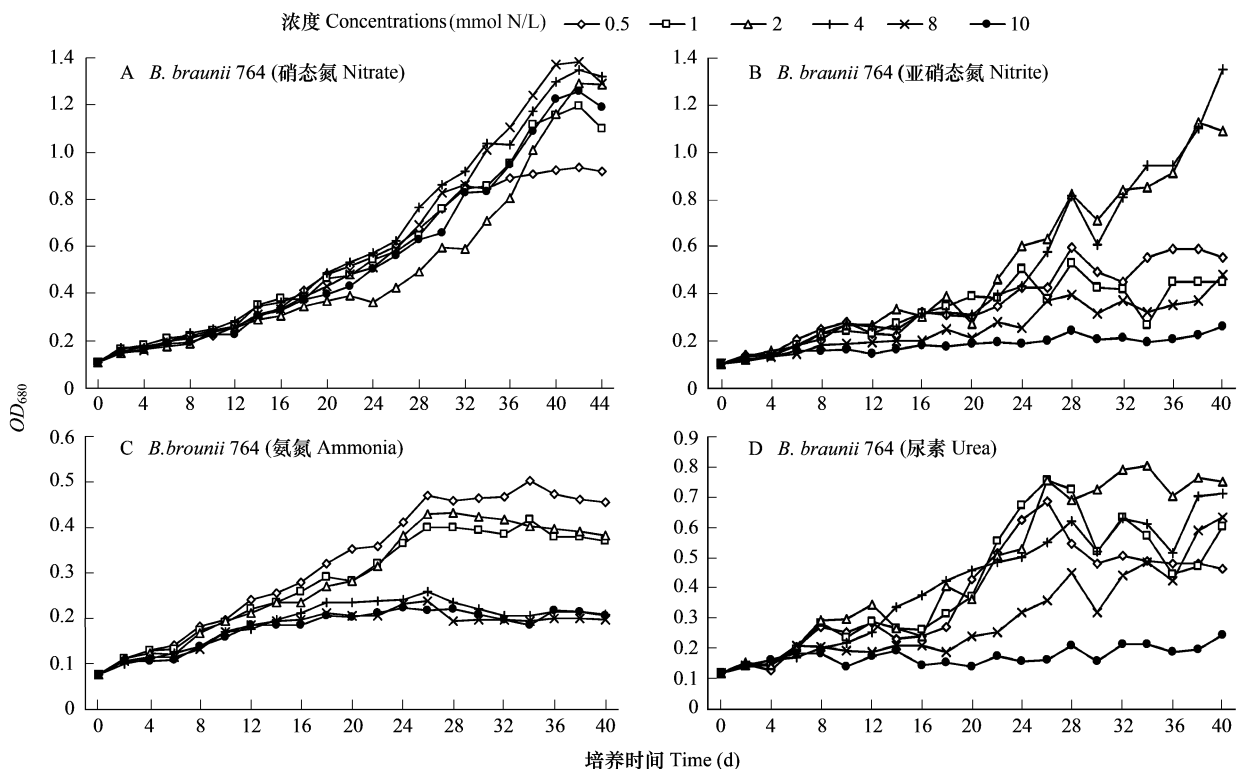


图 1 *B. braunii* 764 在不同浓度硝态氮、亚硝态氮、氨氮和尿素处理下的 OD_{680} 值

Fig. 1 OD_{680} of *B. braunii* 764 under different concentrations of nitrate, nitrite, ammonia and urea

硝态氮促进其生长,而低浓度的氨氮对于其生长较为有利。

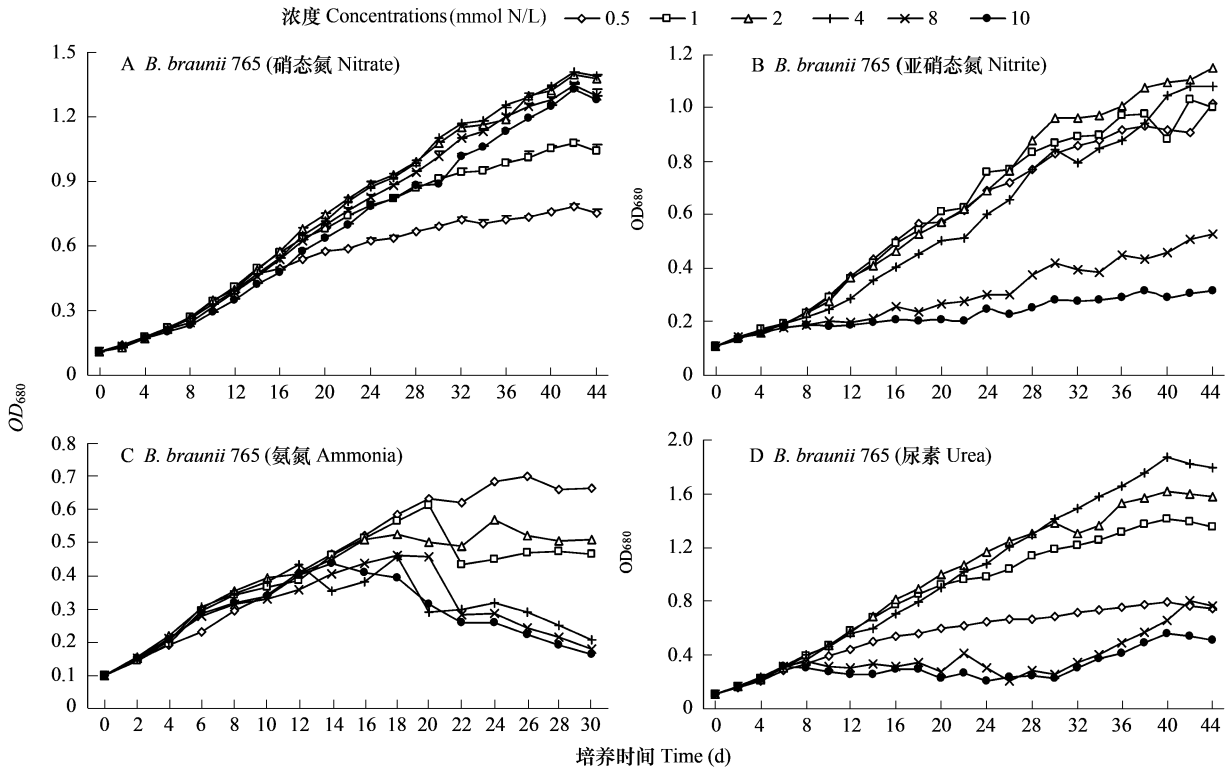


图2 *B. braunii* 765 在不同浓度硝态氮、亚硝态氮、氨氮和尿素处理下的 OD_{680} 值

Fig.2 OD_{680} of *B. braunii* 765 under different concentrations of nitrate, nitrite, ammonia and urea

2.2 不同氮源对两株布朗葡萄藻生物量的影响

试验结果表明, *B. braunii* 764 和 *B. braunii* 765 在硝态氮、亚硝态氮、氨氮和尿素及其浓度下的最大生物量均呈现先上升后下降的趋势(图 3a 和 b)。对于 *B. braunii* 764 而言,其中以硝态氮为氮源时,随着其浓度的升高,生物量逐渐增加,最高达 1.81 g/L,显著高于其它 3 种氮源试验组($p < 0.05$)。对于 *B. braunii* 765 而言,同样是以硝态氮为氮源时,其生物量最高达 2.15 g/L,高于其它试验组,而以氨氮为氮源时,各组生物量均不高,最高仅 0.52 g/L。

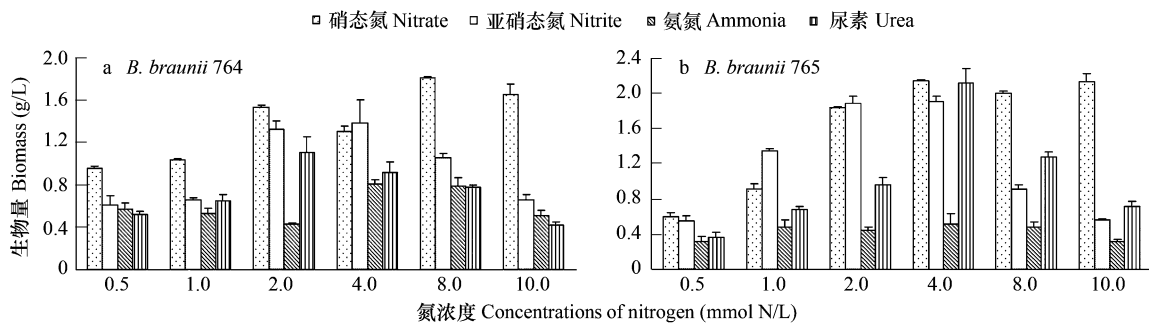


图3 *B. braunii* 764 (a) 和 *B. braunii* 765 (b) 在不同浓度(mmol N/L)硝态氮、亚硝态氮、氨氮和尿素处理下的生物量

Fig. 3 Biomass (Dry weight) of *B. braunii* 764 (a) and *B. braunii* 765 (b) under different concentrations (mmol N /L) of nitrate, nitrite, ammonia and urea

2.3 不同氮源对布朗葡萄藻总脂含量的影响

不同氮源对 *B. braunii* 764 和 *B. braunii* 765 总脂含量的影响见图 4。对于 *B. braunii* 764 而言,其总脂含

量随着氮浓度的增加表现出先增加后下降的趋势,但以硝态氮为氮源时,当氮浓度达到 2 mmol N/L 时,其总脂含量达到最大值,占细胞干重的 27.61%,显著高于其它试验组 ($p < 0.05$),其次是尿素和亚硝态氮对其总脂含量影响较大,而氨氮对其总脂含量影响均不大,最大占细胞干重的 17.44%; *B. braunii* 765 的总脂含量均不高,以亚硝态氮为氮源时,当氮浓度达到 2 mmol N/L 时,其最大总脂含量为 15.75%,其次是硝态氮,而氨氮和尿素对其总脂含量影响均不大,最大总脂含量均不超过 10%。

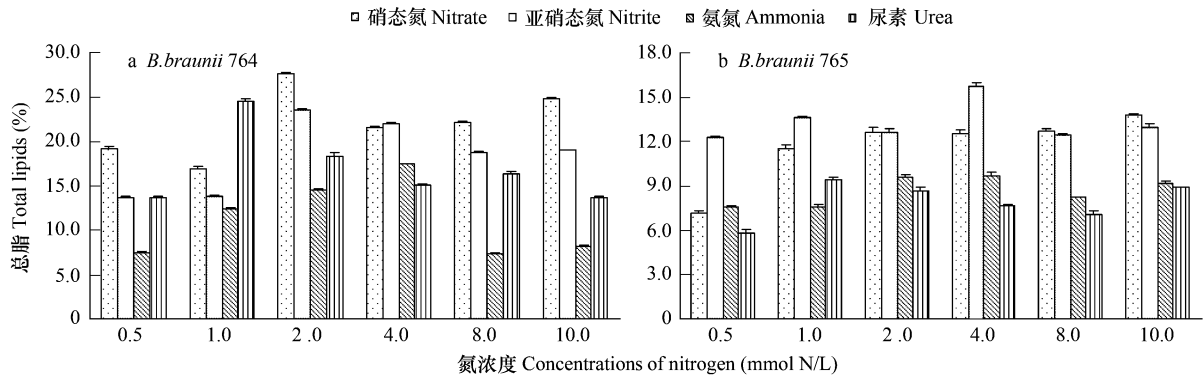


图 4 *B. braunii* 764 (a) 和 *B. braunii* 765 (b) 在不同浓度 (mmol N/L) 硝态氮、亚硝态氮、氨氮和尿素处理下的总脂含量

Fig. 4 The content of total lipids of *B. braunii* 764 (a) and *B. braunii* 765 (b) under different concentrations (mmol N/L) of nitrate, nitrite, ammonia and urea

2.4 不同氮源对两株葡萄藻总烃含量的影响

4 种氮源及其浓度对 *B. braunii* 764 和 *B. braunii* 765 总烃含量的影响结果见图 5。对于 *B. braunii* 764 而言,以硝态氮为氮源时,其总烃含量随着氮浓度的增加表现出先增加后下降的趋势,当氮浓度为 2 mmol N/L 时,其总烃含量达到最大值,占干重的 34.21%,高于其他试验组 ($p < 0.05$),其次是亚硝态氮和尿素,而氨氮对其总烃含量影响不大,最大占细胞干重的 11.70%; 对于 *B. braunii* 765 而言,以硝态氮为氮源时同样表现出了与 *B. braunii* 764 相同的趋势,当氮浓度为 8 mmol N/L 时,其总烃含量达到最大值,占细胞干重的 27.89%,高于其他试验组 ($p < 0.05$),亚硝态氮和尿素次之,以氨氮为氮源时,其总烃含量随着氮浓度的增加而逐渐下降,可能是由于氨氮浓度的增加,抑制了细胞的生长,最终降低了总烃含量的增加。

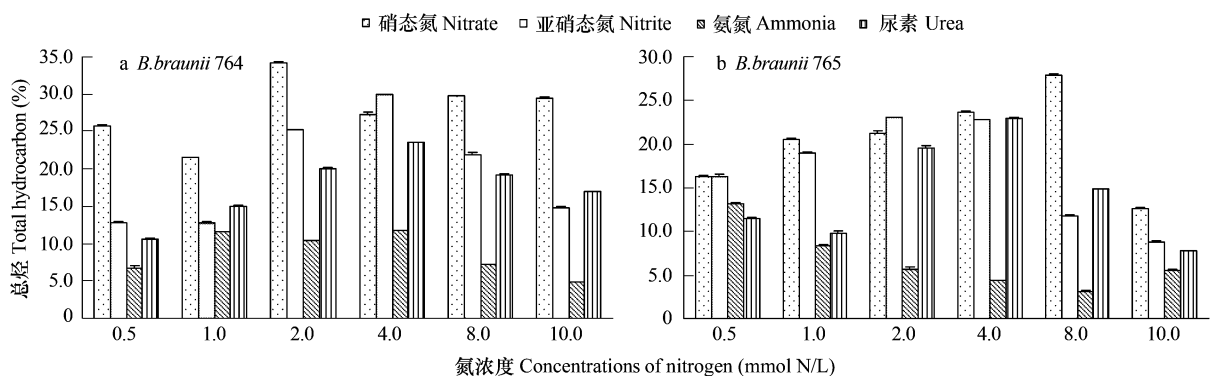


图 5 *B. braunii* 764 (a) 和 *B. braunii* 765 (b) 在不同浓度 (mmol N/L) 硝态氮、亚硝态氮、氨氮和尿素处理下的总烃含量

Fig. 5 The content of total hydrocarbons of *B. braunii* 764 (a) and *B. braunii* 765 (b) under different concentrations (mmol N/L) of nitrate, nitrite, ammonia and urea

3 讨论

研究表明,藻类能利用各种形态的氮,无机氮如 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N,以及有机氮如尿素、核酸和一些溶解性的游离氨基酸等^[14-16]。

本研究发现,葡萄藻能利用无机氮 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和有机氮尿素进行生长,但是在利用效率上差异较大,并且对于其各项生理指标的影响也不相同。通过对 *B. braunii* 764 和 *B. braunii* 765 在 4 种氮源 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\text{NH}_2 \text{CONH}_2$ 中生长情况的比较来看(表 1,表 2),*B. braunii* 764 生长速度较 *B. braunii* 765 缓慢,但是 *B. braunii* 764 的总脂和总烃含量均较 *B. braunii* 765 高,最高分别达 27.61% 和 34.21%。以 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 为氮源时,*B. braunii* 764 的细胞密度、生物量、总脂和总烃含量分别为 1.38、1.81 g/L、27.61% 和 34.21%,均显著高于其它试验组,当以 $\text{NH}_2 \text{CONH}_2$ 为氮源时,*B. braunii* 765 的细胞密度最高(1.87),而以 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 为氮源时,其生物量(2.15 g/L)和总烃含量(27.89%)最高,而 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 虽能维持二者生长,但是对其生长促进作用均较弱,在实验过程中发现培养液中的 pH 值逐渐下降,到生长末期在 4.0 左右,严重影响了这两株藻的生长。综合考虑,*B. braunii* 764 可以作为一种较有潜力的能源微藻进行开发利用。

表 1 *B. braunii*764 的细胞密度、生物量、总脂和总烃含量Table 1 Optical density (OD_{680}), biomass (DW, g/L), total lipids (%) and total hydrocarbons (%) of *B. braunii* 764

	细胞 OD 值 Optical density *	生物量 Biomass(g/L)	总脂含量 Total lipids(%)	总烃含量 Total hydrocarbons(%)
NaNO_3	8mmol/L 1.384	8mmol/L 1.81	2mmol/L 27.61	2mmol/L 34.21
NaNO_2	4mmol/L 1.354	4mmol/L 1.385	2mmol/L 23.51	4mmol/L 29.87
$\text{NH}_4 \text{Cl}$	0.5mmol/L 0.503	4mmol/L 0.81	4mmol/L 17.44	4mmol/L 11.7
$\text{NH}_2 \text{CONH}_2$	1mmol/L 0.805	1mmol/L 1.1	0.5mmol/L 24.52	2mmol/L 23.51

* Maximal OD_{680} 表 2 *B. braunii*765 的细胞密度、生物量、总脂和总烃含量Table 2 Optical density (OD_{680}), biomass (DW, g/L), total lipids (%) and total hydrocarbons (%) of *B. braunii* 765

	细胞 OD 值 Optical density *	生物量 Biomass(g/L)	总脂含量 Total lipids(%)	总烃含量 Total hydrocarbons(%)
NaNO_3	4mmol/L 1.41	4mmol/L 2.15	10mmol/L 13.79	8mmol/L 27.89
NaNO_2	2mmol/L 1.15	4mmol/L 1.91	4mmol/L 15.75	2mmol/L 23
$\text{NH}_4 \text{Cl}$	0.5mmol/L 0.7	4mmol/L 0.52	4mmol/L 9.67	0.5mmol/L 13.18
$\text{NH}_2 \text{CONH}_2$	2mmol/L 1.87	2mmol/L 2.12	0.5mmol/L 9.41	2mmol/L 22.96

* Maximal OD_{680}

目前关于氮源对微藻生长影响的研究较多,但是不同微藻对氮源的利用差异较大,而且对于细胞生化组成的影响也很大。一般认为 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 最容易被藻类利用,在 GS/GOAT 的作用下,可以通过转氨基作用,迅速合成氨基酸^[17],但是随着 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的消耗,培养液中的 pH 值逐渐下降,抑制了微藻的生长,影响了生物量和其它细胞生化组成的增加,本研究结果也说明了这一点;而 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 则必须经过相应的硝酸还原酶和亚硝酸还原酶还原成 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$,尿素则要经过尿素酶脱羧形成 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ ^[17],最终被微藻所利用。

不同的微藻对于氮源有不同的适应性,硝态氮为紫球藻最适氮源,利于其蛋白的大量合成,铵态氮不利于其生长^[18];眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*)以 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为氮源时,EPA 的含量最高为 17.8%,显著高于以硝态氮为氮源时的含量^[19];Yang 等^[20]研究了葡萄藻对亚硝酸盐利用的情况,当在培养基中同时添加硝酸盐和亚硝酸盐时,布朗葡萄藻利用完硝酸盐后会继续利用亚硝酸盐;当单独添加亚硝酸盐时,2.0 mmol N/L 的亚硝酸盐利于葡萄藻的生长,与添加 4.0 mmol N/L 的硝酸盐效果类似,由此可见,布朗葡萄藻对于硝酸态氮和亚硝酸态氮均能不同程度的利用。本研究中,硝酸态氮是 *B. braunii* 764 和 *B. braunii* 765 较好的氮源。除了氮源以外,氮的浓度对藻类生长的影响也较大,当氮浓度低于 1.8 mmol N/L 时,三角褐指藻以氨氮为氮源时生长较快,而当氮浓度高于 3.5 mmol N/L 时,以尿素为氮源时较适宜,而且氮浓度明显地影响微藻的脂肪酸组成,当氮浓度较低时,EPA 含量随着氮浓度增加而上升,当培养基中氮浓度达到一定水平后,EPA 含量随着氮浓度的增加而降低^[9];当 KNO_3 浓度为 0.05 g/L 时,*B. braunii* SAG30.81 的产烃量最大,占干重的 50%,生物量达 0.65 g/L^[21];氮对布朗葡萄藻的光合放氧速率影响较大,当 KNO_3 为 100 mg/L 时,布朗葡萄藻

的净光合放氧速率最快,而进一步提高 KNO_3 浓度,光合作用速率并不随之升高^①。在本试验中,*B. braunii* 764 和 *B. braunii* 765 的生长情况基本上都是随着氮浓度的增加表现出先上升后下降的趋势。

References:

- [1] Hu H J, Wei Y X. The freshwater algae of China-Systematics, Taxonomy and Ecology. Beijing: Science Press, 2006. 286.
- [2] Largeau C, Casadevall E, Berkaloff C, et al. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 1980, 19:1043 – 1051.
- [3] Brown A C, Knights B A. Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 1969, 8(3):543 – 554.
- [4] Casadevall E, Dif D, Largeau C. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 27(3): 286 – 295.
- [5] Song Y T. Study Hydrocarbon of *Botryococcus*. *Oil and Gas Geology*, 1991, 12(1): 22 – 33.
- [6] Liu X J, Duan S S, Li A F. Effects of organic carbon sources and nitrogen sources on the growth of *Phaeodactylum tricornutum*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(2):252 – 257.
- [7] Li J H, Weng Y P, Hu H P, et al. Effects of three nitrogen sources on the growth and β -carotene accumulation in *Dunaliella salina*. *Journal of Nanjing Normal University(Natural Science Edition)*, 1999, 12(3):73 – 76.
- [8] You S, Zheng B S, Guo S Y. Effect of nitrogen on accumulation of *Spirulina Platensis* exopolysacchride. *Food Science*, 2004, 25(4): 32 – 35.
- [9] Jiang H M, Gao K S. Effects of nitrogen sources and concentrations on the growth and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(5):545 – 551.
- [10] Zhang Y Y, Chen B L, Liu M. Effect of KNO_3 concentrations on the growth and physiological characteristics of *Rhodella reticulata*. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2008, 26(1):76 – 80.
- [11] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911 – 917.
- [12] Chen F, Johns M R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 1991, 3:203 – 209.
- [13] Sawayama S, Minowa T, Dote Y. Growth of the hydrocarbon rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 38(2):135 – 138.
- [14] Takahashi M M. Physiological Characteristics. In: Tomotoshi Okaichi ed. *Red Tides*. Tokyo: Terra Scientific Publishing Company, 2003, 136 – 144.
- [15] Glibert P M, Magnien R, Lomas M W, et al. Harmful algal blooms in the Chesapeake and coastal bays of Maryland, USA: Comparison of 1997, 1998, 1999 events. *Estuaries*, 2001, 24(6):875 – 883.
- [16] Fan C L, Glibert P M, Burkholder J M. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationship for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures. *Harmful Algae*, 2003, 2(4):283 – 299.
- [17] Zou J Z, Li F D, Huang C J. Nutrition mechanisms of harmful algae. In: Qi Y Z ed. *China coastal harmful algae blooms*. Beijing: Science Press, 2003. 80.
- [18] Xiao H S, Xie Z Q, Guo J S, et al. Effects of five different nitrogen resources on *Porphyridium purpureum* growth. *Journal of Fujian Teachers University(Natural Science)*, 2001, 17(2):78 – 80.
- [19] Renaud S M, Parry D L, Thinh L V, et al. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 1991, 3:43 – 53.
- [20] Yang S L, Wang J, Cong W, et al. Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Letters*, 2004, 26: 239 – 243.
- [21] Dayananda C, Sarada R, Bhattacharya S, et al. Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry*, 2005, 40:3125 – 3131.

参考文献:

- [1] 胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类——系统、分类及生态. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2006. 286
- [5] 宋一涛. 丛粒藻类的研究. *石油与天然气地质*, 1991, 12(1): 22 ~ 33.
- [6] 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬. 有机碳源和氮源对三角褐指藻生长的影响. *水生生物学报*, 2008, 32(2):252 ~ 257.
- [7] 李建宏, 翁永萍, 胡寒萍, 等. 不同氮源对盐生杜氏藻生长和 β -胡萝卜素积累的影响. *南京师范大学学报(自然科学版)*, 1999, 12(3): 73 ~ 76.
- [8] 尤珊, 郑必胜, 郭祀远. 氮源对螺旋藻生长及胞外多糖的影响. *食品科学*, 2004, 25(4): 32 ~ 35.
- [9] 蒋汉明, 高坤山. 氮源及其浓度对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响. *水生生物学报*, 2004, 28(5):545 ~ 551.
- [10] 张艳燕, 陈必铨, 刘梅. 不同硝酸钾浓度对蔷薇藻生长及生理特性的影响. *武汉植物学研究*, 2008, 26(1):76 ~ 80.
- [17] 邹景忠, 李福东, 黄长江. 赤潮生物的营养机理. 见: 齐雨藻等著. *中国沿海赤潮*. 北京: 科学出版社, 2003. 80.
- [18] 肖华山, 谢志强, 郭建生, 等. 5 种不同形式氮源对紫球藻生长影响的研究. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2001, 17(2):78 ~ 80.

① 殷大聪. 几种主要环境因子对布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*)光合作用的影响, 硕士学位论文, 中国科学院武汉植物园, 2007 年